

Studies on genes enhancing heavy metal tolerance and accumulation in plants towards improving phytoremediation strategies(**ファイトレメデーション技術確立に向けた植物での重金属耐性および重金属蓄積性を高める遺伝子に関する研究**)

著者	倉俣 正人
号	6
学位授与番号	140
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/44043">http://hdl.handle.net/10097/44043</a>

	くらまた まさと
氏名（本籍地）	倉 俣 正 人（愛知県）
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第140号
学位授与年月日	平成21年 1月 7日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 , 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 (博士課程) 分子生命科学専攻
論 文 題 目	Studies on genes enhancing heavy metal tolerance and accumulation in plants towards improving phytoremediation strategies (ファイトレメデーション技術確立に向けた植物での重金属耐性および重金属蓄積性を高める遺伝子に関する研究)
博士論文審査委員	(主査) 教 授 草 野 友 延 教 授 高 橋 秀 幸 教 授 渡 辺 正 夫

## 論文内容の要旨

現代文明は、重金属を含む様々な金属資源によって支えられている、と言っても過言ではない。元来、地球の内部に位置していた金属資源は、産業の進展に伴い、大量に採掘そして運び出され、土壌圏へと拡散してきた。例えば、産業が活発に行われている地帯の土壌圏に含まれる鉛、水銀およびカドミウム(Cd)の濃度は、岩石圏の値に比べ、それぞれ約10倍、6倍および5倍にもなる、との報告もある。人間活動がもたらした重金属による土壌や水質の汚染は、現在も世界規模で著しく拡大している。土壌中の重金属の毒性および可動性は、一般に環境の酸性化によって強まる。従って、重油や石炭の燃焼によって大気中に放出される硫酸酸化物などに起因する酸性雨などの増加と相俟って、相乗的に地球環境の悪化をもたらす結果となっている。

近年日本において、重金属の中でも特にCd汚染の問題が注目されている。日本における米の可食部のCdの基準値は従来0.4mg/kgであったが、2008年FAO/WHOのCODEX委員会は米の中のCd含量は0.2mg/kg未満であるべきだと規定した。日本人の食品からのCd摂取量の約半分は、米由来と言われている。これにより環境中、特に土壌Cd汚染の改善が急務の課題として浮上してきた。重金属による土壌汚染の浄化法として、土壌置換法や化学的洗浄法であるリーチング法が活用されている。こうした物理化学的手法は、短期間に浄化が完了する長所をもつ一方で、高コストであり、効果が一時的であるなどの短所が指摘されている。そこで、植物を用いた土壌修復技術であるファイトレメデーションが注目を集めている。ファイトレメデーションの原理は、植物の養分吸収を利用し、汚染重金属を地上部組織に蓄積させることである。地上部バイオマスは収穫され、数回の栽培を経て土壌中の汚染重金属を除去するというものである。この生物的手法は、高濃度の汚染地帯に適用出来ないことや長時間を要するといった短所があるものの、低コストで効果が持続的であると考えられている。

Cdに対する応答は植物によって様々で、グンバイナズナ(*Thlaspi caerulescens*)及びハクサンハタザオ(*Arabidopsis halleri*)は、Cd高蓄積植物として知られている。しかし、機械を用いた栽培管理技術が確立していない点や、生育が遅く、バイオマスが小さいという観点から、ファイトレメデーションに用いる植物として必ずしも適しているとは言えない。すなわち、ファイトレメデーションに利用する植物は、一定の地上部バイオマスを持ち、栽培管理が確立されていることが前提条件として求められる。さらに本手法が広く利用される技術となるには、利用される植物が(1)根での強い重金属吸収能をもつ、(2)根部から地上部への強い重金属輸送能をもち、さらには(3)地上部組織での高い重金属無毒化能もしくは高い隔離能を持つ、ことが必要と考えられる。

本研究では、ファイトレメデーション法の技術確立に向けての基礎的研究を行った。本論文は2つの章が

ら構成されるが、第一章では重金属耐性や輸送に関与することが知られている既知遺伝子の中に、上記(1)～(3)の過程を強化できるものを同定しようとの考えのもとに研究を行った。Cdによって引き起こされる植物体内での生理的な応答、そしてこの過程に関与する遺伝子（例えばメタロチオネイン遺伝子やファイトケラチン合成酵素遺伝子など）が、これまでの生理学や分子生物学などの研究を通じて明らかにされつつある。しかし、まだ植物のCd応答反応、そしてそれらの過程に関与する遺伝子の全てが解明されたわけではない。植物のCdに対する未知の応答メカニズムを解明することは、ファイトレメデーション技術を改良するための重要な情報になると考えられる。そこで、第二章では国内の鉱山跡地に自生していた植物を遺伝子源として、新規な重金属関連遺伝子の探索そして同定を行った。

第一章では、細菌由来の水銀輸送体遺伝子(*merC*)とコムギ(*Triticum aestivum*)由来のシステイン合成酵素遺伝子(*WcysI*)が、それぞれ上記(1)と(3)の過程を強化することが出来るかを否か、を評価した。この際、一定量の地上部バイオマスがあり、栽培管理が確立しているイネへこれらの遺伝子を導入することで評価を行った。鉄酸化細菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)由来の *merC* 遺伝子は水銀イオン輸送体をコードし、水銀還元酵素遺伝子 *merA* とともに水銀耐性遺伝子群を構成する。この細菌由来の *merC* 遺伝子を過剰発現する形質転換イネは、水銀と同様にCdに対する感受性が増しているものの、他の金属に対する感受性は野生株のイネと変わらなかった。次に実際のCd汚染地の土壌を用いたポット栽培を行って、*merC*を過剰発現するイネが対照イネに比べ、約20%ほど多くCdを地上部に蓄積させることを示した。イネ植物における狭い重金属特異性と過剰発現による地上部へのCd蓄積性の増加から、*merC*遺伝子は根でのCd吸収能を高める分子ツールとして有効であると結論した。

*WcysI*は、コムギから単離されたシステイン合成酵素遺伝子である。アミノ酸の一種のシステインをより多く供給することは、グルタチオン、メタロチオネインやファイトケラチンによる重金属(Cdを含む)の無毒化や重金属を液胞へ隔離する能力の強化へつながると考え、*WcysI*過剰発現イネを作成した。グルタチオンの多くの供給は、Cdに起因する活性酸素ストレスの軽減効果も期待された。事実、*WcysI*過剰発現イネではCd処理後に非タンパク性チオール含量が高まっており、対照のイネに比べCdによる根の成長阻害が軽減することを示した。対照イネと比べ、*WcysI*過剰発現イネ地上部の新鮮重量には大きな差が見られなかったが、葉の褐変の進行が明らかに遅れることを観察した。従って、*WcysI*遺伝子も植物のCd耐性能を高めるのに有用な遺伝子であると結論した。

第二章では、Cd代謝に関わる植物由来の新規遺伝子の探索を行った。ハイスループットな遺伝子探索を行うために、Cd高感受性の酵母( $\Delta ycf1$ 変異株)を用いた。酵母 *YCF1*は、液胞局在のCd輸送体をコードする。従って、この遺伝子を欠損した酵母株は、Cdを液胞に隔離することが出来ず、Cdに対し非常に感受性となる。探索遺伝子源は、秋田県の尾去沢鉱山跡地から採取した2つの植物、メヒシバ *Digitaria ciliaris* (Retz.)

Koel とブタナ *Hypochoeris radicata* を用いた。得られた 33 個の Cd 耐性候補クローンのうち、メヒシバ *D. ciliaris* から単離された新規の Cd 耐性遺伝子 (*DcCDT1*) の機能について、さらに解析を進めた。この遺伝子の産物は 55 個のアミノ酸で構成され、うち 15 個がシステイン残基であった。データベース解析の結果、相同遺伝子の予想遺伝子産物は高度に保存されていること、植物に特有の遺伝子であること、が明らかとなった。*DcCDT1* 過剰発現出芽酵母とシロイヌナズナは共に、それぞれの野生株のものと比べ、細胞内の Cd 含量が 50% 程度に低下しており、このことが Cd 耐性となる原因と考えられた。イネ植物には 5 種類の *DcCDT1* 相同遺伝子 (*OsCDT1-5*) が存在した。このうちの *OsCDT1* を過剰発現したシロイヌナズナでも Cd 耐性となることを確認している。*DcCDT1* タンパク質と *OsCDT1* タンパク質の細胞内局在を、GFP タンパク質との融合法で調べたところ、両タンパク質とも原形質膜と細胞壁に局在していることが分かった。上記の結果を踏まえると、これらの遺伝子は細胞内に取り込まれた Cd を細胞外へ排出している、もしくは細胞表層で Cd の吸収を抑制することに関与していると推察した。

上述のように、メヒシバから Cd の細胞内蓄積を抑える機能を持つ *DcCDT1* 遺伝子を同定した。この *DcCDT1* に相同な遺伝子がイネを含む多くの植物に存在した。この事実は、植物の Cd 適応機構の全てが解明されているわけではないことを強く示している。従って、ファイトレメデーション技術の改良のためには、より一層の基礎的研究が重要であろうと考える。今後は、単一遺伝子の導入でなく、同じイネ宿主に複数の遺伝子を導入することが必要である。本研究で用いた遺伝子を例に述べると、*merC* 遺伝子と *WcysI* 遺伝子をそれぞれ過剰発現もしくは Cd 誘導性のプロモーター支配下に発現させる、そして RNA 干渉法で *OsCDT1-5* の全てを不活性化したイネ植物では、野生型のイネに比べ、Cd のより高い蓄積が期待される。

最後に、本研究は日本において栽培管理技術が確立されており、かつ地上部のバイオマス量も十分あるイネを中心として進めた。植物研究のモデルともなっているイネは、遺伝子工学の適用も容易である。今後、イネを基盤としたファイトレメデーションの技術確立に向けた研究がさらに進展し、一刻も早期に Cd をはじめとした重金属汚染の浄化に適用されることを期待する。

#### Publications:

1. Kuramara, M., Masuya, S., Takahashi, Y., Kitagawa, E., Inoue, C., Ishikawa, S., Youssefian, S., Kusano, T.  
Novel cysteine-rich peptides from *Digitaria ciliaris* and *Oryza sativa* enhance tolerance to cadmium by limiting its cellular accumulation. Plant and Cell Physiology in press.
2. Nakamura, M., Kuramata, M., Kasugai, I., Abe, M., Youssefian, S.  
Increased thiol biosynthesis of transgenic poplar expressing a wheat O-acetylserine (thiol) lyase enhances resistance to hydrogen sulfide and sulfur dioxide toxicity. Plant Cell Reports in press.

## 論文審査結果の要旨

倉俣正人は、重金属汚染に対し植物を用いて除染しようという、いわゆるファイトレメデーションの技術確立に向けた基礎的な研究を行った。彼は、重金属の中でも、特にカドミウム(Cd)に焦点をあてて研究を進めた。ファイトレメデーション技法を確立するためには、用いる植物の栽培管理が確立していること、そしてその植物の地上部のバイオマスが十分であることが要求される。こうした条件を満たす植物の一つとしてイネが注目されている。

第一章では、既知の重金属関連遺伝子の中から、イネへ Cd 蓄積性を付与できると期待される 2 つの遺伝子を導入し、評価を行った。細菌由来の水銀イオン輸送体遺伝子 *merC* を導入したイネは、実際の Cd 汚染土壌から対照のイネに比べて 20%以上多く Cd を吸い上げた。小麦由来の *Wcya1* はシステイン合成酵素遺伝子である。システインをより多く供給することは、Cd の無毒化や液胞へ隔離する能力の強化へつながると考え、*Wcys1* 過剰発現イネを作成した。この形質転換イネでは Cd 処理後に非タンパク性チオール含量が高まっており、対照のイネに比べ Cd による根の成長阻害が軽減することを示した。対照イネと比べ、*Wcys1* 過剰発現イネ地上部の新鮮重量には大きな差が見られなかったが、葉の褐変化の進行が明らかに遅れることを観察した。従って、*Wcys1* 遺伝子も植物の Cd 耐性能を高めるのに有用な遺伝子であることを、明らかにした。

第二章では、植物由来の新規 Cd 耐性遺伝子の探索を行い、33 個の遺伝子を同定した。彼はこのうちのメヒシバ由来の *DeCDT1* に着目し、更なる解析を行った。この遺伝子の産物は、55 個のアミノ酸で構成され、うち 15 個がシステイン残基であった。*DeCDT1* 過剰発現出芽酵母とシロイヌナズナは共に、それぞれの野生株のものとは比べ、細胞内の Cd 含量が 50%程度に低下しており、このことが Cd 耐性となる原因である、と考察した。イネ植物には 5 種類の *DeCDT1* 相同遺伝子 (*OsCDT1-5*) が存在した。このうちの *OsCDT1* を過剰発現したシロイヌナズナも Cd 耐性となることを確認した。*DeCDT1* タンパク質と *OsCDT1* タンパク質は原形質膜と細胞壁に局在していることから、これらのシステインリッチなペプチドは細胞内に取り込まれた Cd を細胞外へ排出している、もしくは細胞表層で Cd の吸収を抑制することに関与していると推察した。

上記の論文内容は、倉俣が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、倉俣正人提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。